

DIALOG(R) File 352:DERWENT WPI
(c) 2000 Derwent Info Ltd. All rts. reserv.

012170381

WPI Acc No: 98-587292/199850

Oligonucleotide having specific and non-specific regions - useful in
hybridisation assay for sequencing of nucleic acids

Patent Assignee: MITSUBISHI CHEM CORP (MITU)

Number of Countries: 001 Number of Patents: 001

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Main IPC	Week
JP 10262675	A	19981006	JP 9769972	A	19970324	C12N-015/09	199850 B

Priority Applications (No Type Date): JP 9769972 A 19970324

Patent Details:

Patent	Kind	Lan	Pg	Filing Notes	Application	Patent
JP 10262675	A		13			

Abstract (Basic): JP 10262675 A

An oligonucleotide having a specific region (SR) and one or two nonspecific regions (NSR) connected to at least 1 of end of SR, is new. The SR has a specific base sequence substantially complementary to the target sequence in the sample nucleic acid to be hybridised with the oligonucleotide. The NSR consists of at least 1 nucleotide, where each nucleotide has hypoxanthine, 5-nitroindol or 3-nitropyrrol as a base and at least 1 nucleotide in each NSR has 5-nitroindol or 3-nitropyrrol as a base. Also claimed is sequencing of a nucleic acid comprising: (i) hybridizing the oligonucleotide with the sample nucleic acid, and (ii) determining the presence of a target sequence having a sequence complementary to the base sequence of SR region by measuring the intensity or the presence of hybridisation.

ADVANTAGE - The hybridisation sensitivity of the method can be increased.

Dwg. 0/2

Derwent Class: B04; D16; S03

International Patent Class (Main): C12N-015/09

International Patent Class (Additional): C07H-021/04; C12Q-001/68;

G01N-033/53; G01N-033/566

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平10-262675

(43) 公開日 平成10年(1998)10月6日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	F I	
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 15/00	Z N A A
C 0 7 H 21/04		C 0 7 H 21/04	B
C 1 2 Q 1/68		C 1 2 Q 1/68	A
// G 0 1 N 33/53		G 0 1 N 33/53	M
33/566		33/566	
審査請求 未請求 請求項の数 8 O L (全 13 頁)			

(21) 出願番号 特願平9-69972

(22) 出願日 平成9年(1997)3月24日

(71) 出願人 000005968

三菱化学株式会社

東京都千代田区丸の内二丁目5番2号

(72) 発明者 桑原 孔一郎

茨城県稲敷郡阿見町中央八丁目3番1号三

菱化学株式会社筑波研究所内

(72) 発明者 畠山 和久

茨城県稲敷郡阿見町中央八丁目3番1号三

菱化学株式会社筑波研究所内

(72) 発明者 寺沢 真人

茨城県稲敷郡阿見町中央八丁目3番1号三

菱化学株式会社筑波研究所内

(74) 代理人 弁理士 遠山 勉 (外2名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 オリゴヌクレオチド及び核酸の塩基配列解析法

(57) 【要約】

【課題】 ハイブリダイゼーション法による核酸の塩基配列解析の精度を高めた塩基配列解析法及びそれに用いるオリゴヌクレオチドを提供する。

【解決手段】 特異的領域と、この特異的領域の両末端の少なくとも一方に連結する1または2の非特異的領域とを有するオリゴヌクレオチドであって、特異的領域は、前記オリゴヌクレオチドをハイブリダイズさせようとする試料核酸中の標的配列に対して実質的に相補的な特定の塩基配列を有し、非特異的領域は、少なくとも一つのヌクレオチドからなり、非特異的領域の各ヌクレオチドはヒポキサンチン、5-ニトロインドールまたは3-ニトロピロールを塩基として有し、各非特異的領域におけるヌクレオチドの少なくとも一つが5-ニトロインドールまたは3-ニトロピロールを塩基として有する、オリゴヌクレオチドを、ハイブリダイゼーション用プローブとして用いる。

NNNNCCGCTCATNNNN

|||||||·|||||

.....CCAACGATCAAGCGAGTTACATGATCC.....

【特許請求の範囲】

【請求項1】 特異的領域と、この特異的領域の両末端の少なくとも一方に連結する1または2の非特異的領域とを有するオリゴヌクレオチドであって、特異的領域は、前記オリゴヌクレオチドをハイブリダイズさせようとする試料核酸中の標的配列に対して実質的に相補的な特定の塩基配列を有し、非特異的領域は、少なくとも一つのヌクレオチドからなり、非特異的領域の各ヌクレオチドはヒポキサンチン、5-ニトロインドールまたは3-ニトロピロールを塩基として有し、各非特異的領域におけるヌクレオチドの少なくとも一つが5-ニトロインドールまたは3-ニトロピロールを塩基として有する、オリゴヌクレオチド。

【請求項2】 前記非特異的領域が、特異的領域の5'末端及び／又は3'末端に連結している請求項1記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項3】 前記非特異的領域が、該非特異的領域内における特異的領域側に、ヒポキサンチンを塩基として有するヌクレオチドを1つ以上含む、請求項1または2記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項4】 特異的領域の長さが6～50塩基であり、非特異的領域の長さが2～20塩基である請求項1～3のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項5】 特異的領域の長さが非特異的領域の長さと同じか又はそれ以上である請求項1～4のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項6】 不溶性担体に固定化された請求項1～5のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項7】 5'末端側の領域で不溶性担体に固定化された請求項6記載のオリゴヌクレオチド。

【請求項8】 請求項1～7のいずれか一項に記載のオリゴヌクレオチドを試料核酸にハイブリダイズさせるステップと、そのハイブリダイゼーション強度またはハイブリダイゼーションの有無により、前記試料核酸中における前記オリゴヌクレオチド中の特異的領域の塩基配列と相補的な配列を有する標的配列の有無を判定するステップとを含む、核酸の塩基配列解析法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、オリゴヌクレオチド及び核酸の塩基配列解析法に関し、詳しくは、核酸の塩基配列決定、感染症や遺伝病の診断、ゲノムマッピング等の核酸の塩基配列解析に使用することができるハイブリダイゼーション用プローブに好適に利用できる新規な構造を有するオリゴヌクレオチド、及びそれを用いた塩基配列解析法に関する。

【0002】

【従来の技術】ハイブリダイゼーションによる核酸の塩基配列解析は、例えば塩基配列決定、感染症や遺伝病の診断、ゲノムマッピング等において広く行われている。

また、SBH (sequencing by hybridization) [R. Drmanac, et al., Science, 260, 1649 (1993)]、すなわちハイブリッド形成による塩基配列決定法は、高速かつ低コストな方法として実用化が期待されている。

【0003】これらの塩基配列解析においては、ハイブリダイゼーション (ハイブリッド形成) によって生じたプローブと標的配列とのハイブリッドの中で、ミスマッチが存在するものと、ミスマッチがなく完全に相補的なものとを区別する技術が必要である。

【0004】ハイブリダイゼーション反応は、反応溶液のイオン強度、プローブ及びサンプルDNAの塩基構成、反応温度・時間等多くの要因によって支配される複雑な反応であるが、短鎖長のオリゴヌクレオチドをプローブとする場合には、ミスマッチを有するハイブリッドは完全に相補的なハイブリッドと比較して不安定なことから、これらの諸条件を適当に設定することによって、完全に相補的なハイブリッドのみが検出できるような系を構築することが理論的に可能であると考えられている。

【0005】しかしながら、従来、高感度のハイブリダイゼーションを得るためにDNAの塩基を化学修飾する手法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 11460 (1993)] やミスマッチの判別能を高めるためのハイブリダイゼーション条件としてハイブリダイゼーション後の洗浄を低温で長時間行う方法 [DNA and Cell Biology, 9, 527 (1990)] が提案されているが、十分な結果が得られていない。

【0006】特に、プローブの末端付近にミスマッチが存在する場合のハイブリダイゼーションと、ミスマッチを含まないハイブリダイゼーションとを正確かつ高感度に区別することは困難であり、これが塩基配列解析の実用化の障壁となっている。

【0007】この問題に関して、特開平8-70900号公報では、一つの解決策が提案されている。すなわち、特開平8-70900号公報には、特異的領域と、この特異的領域の両末端の少なくとも一方に連結する1又は2の非特異的領域とを有するオリゴヌクレオチドであって、特異的領域は、前記オリゴヌクレオチドをハイブリダイズさせようとする試料核酸中の標的配列に対して実質的に相補的な特定の塩基配列を有し、非特異的領域は、通常の核酸を構成する塩基のそれぞれと塩基対を形成することができる他の塩基を有する少なくとも一つのヌクレオチド又はそのオリゴマーからなるオリゴヌクレオチドをハイブリダイゼーション用プローブとして用いることにより、高感度のハイブリダイゼーション結果が得られるとともに、末端にミスマッチを有するハイブリッドを完全に相補的なハイブリッドと明確に区別し得る塩基配列解析方法を提供することが開示されている。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】ハイブリダイゼーション法による核酸の塩基配列解析の精度は一般に高めれば高いほどよい。従って、本発明の目的は、この精度を一層高めるために、高感度のハイブリダイゼーション結果が得られるとともに、末端にミスマッチを有するハイブリッドを完全に相補的なハイブリッドと一層明確に区別し得るオリゴヌクレオチド及び塩基配列解析法を提供することにある。

【0009】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記目的を達成すべく鋭意研究を重ねた結果、核酸の標的配列にハイブリダイズするべく特定の塩基配列を有する領域の末端に、5-ニトロインドールまたは3-ニトロピロールを塩基として含むヌクレオチドからなる領域が結合されたオリゴヌクレオチドを用いれば、高感度のハイブリダイゼーション結果が得られるとともに塩基対のミスマッチが高感度で検出可能なことを見だし、本発明を完成するに至った。

【0010】すなわち本発明は、特異的領域と、この特異的領域の両末端の少なくとも一方に連結する1または2の非特異的領域とを有するオリゴヌクレオチドであって、特異的領域は、前記オリゴヌクレオチドをハイブリダイズさせようとする試料核酸中の標的配列に対して実質的に相補的な特定の塩基配列を有し、非特異的領域は、少なくとも一つのヌクレオチドからなり、非特異的領域の各ヌクレオチドはヒポキサンチン、5-ニトロインドールまたは3-ニトロピロールを塩基として有し、各非特異的領域におけるヌクレオチドの少なくとも一つが5-ニトロインドールまたは3-ニトロピロールを塩基として有する、オリゴヌクレオチドである。

【0011】また本発明の方法は、上記オリゴヌクレオチドを試料核酸にハイブリダイズさせるステップと、そのハイブリダイゼーション強度またはハイブリダイゼーションの有無により、前記試料核酸中における前記オリゴヌクレオチド中の特異的領域の塩基配列と相補的な配列を有する標的配列の有無を判定するステップとを含む、核酸の塩基配列解析法である。

【0012】

【発明の実施の形態】以下、本発明についてさらに詳細に説明する。本明細書においていくつかの術語を用いるが、ここで用いるときそれらの術語は次の意味を有する。

【0013】「試料核酸」とは、塩基配列の解析を目的として本発明のオリゴヌクレオチドとハイブリダイズさせる核酸を意味し、DNAであってもRNAであってもよい。「特異的領域」とは、ハイブリダイズしうる試料核酸中の標的配列と塩基配列の相補性を有し、各塩基がこの標的配列と対合を形成しうる領域を意味する。

【0014】本発明のオリゴヌクレオチドは、特異的領

域と、この特異的領域の両末端の少なくとも一方に連結する1または2の非特異的領域とを有する。本発明のオリゴヌクレオチドは、オリゴデオキシリボヌクレオチドであってもよく、またオリゴリボヌクレオチドであってもよい。

【0015】特異的領域は、試料核酸中の標的配列に対して実質的に相補的な特定の塩基配列を有する。「実質的に相補的」とは、標的配列に対して完全に相補的である場合の他、少なくとも1塩基のミスマッチを存在する場合を含むことを意味する。特異的領域の長さは、ハイブリダイゼーションにおいてプローブとして機能しうる長さであれば特に制限されるものでないが、通常6〜50、好ましくは6〜20塩基程度の長さが適当である。ハイブリダイゼーション領域DNAの塩基配列もまた特に制限されるものでなく、塩基配列の解析対象となるサンプルDNAの塩基配列に応じてその配列を適宜決定することができる。

【0016】非特異的領域は、少なくとも一つのヌクレオチドからなる。その各ヌクレオチドはヒポキサンチン、5-ニトロインドールまたは3-ニトロピロールを塩基として有する。非特異的領域（特異的領域の両側にある場合には各非特異的領域）におけるヌクレオチドの少なくとも一つは5-ニトロインドールまたは3-ニトロピロールを塩基として有する。

【0017】5-ニトロインドールおよび3-ニトロピロールは、通常の核酸を構成する塩基のいずれとも同等に結合するユニバーサル塩基として知られている（Nucleic Acids Research, 1994, Vol. 22, No. 20, p. 4039-4043およびNucleic Acids Research, 1995, Vol. 23, No. 13, p. 2361-2366）。ここで「通常の核酸を構成する塩基」とは、DNA又はRNAを構成するヌクレオチドに含まれる塩基、すなわちDNAにあつてはアデニン（A）、グアニン（G）、シトシン（C）、チミン（T）の4種類の塩基を、RNAにあつてはA、G、C及びウラシル（U）を意味する。

【0018】非特異的領域は、該非特異的領域内における特異的領域側に、すなわち、特異的領域に隣接する部分に、ヒポキサンチンを塩基として有するヌクレオチドを1つ以上含むことが好ましい。

【0019】非特異的領域の長さは、少なくとも1、好ましくは2〜20、より好ましくは2〜8塩基とすることができる。非特異的領域が特異的領域に連結する位置もまた特に制限がなく、特異的領域の5'末端、3'末端のいずれでもよい。さらに特異的領域の5'末端及び3'末端の両方に非特異的領域が連結されていてもよい。これらの中では後者が好ましい。

【0020】特異的領域の長さとは非特異的領域の長さとの比は、特異的領域の長さやGC含量によっても異なるが、通常、特異的領域の長さが非特異的領域の長さと同じか又はそれ以上であることが好ましい。

10

20

30

40

50

【0021】本発明のオリゴヌクレオチドの合成法については特に限定されるものではなく、例えば、 β -シアノエチルホスホアミダイト法 [Nucleic Acids Res. 12 4539 (1984)]、リン酸トリエステル法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 5956 (1984)]、ホスホン酸エステル法 [Nucleic Acids Res. 14 5399 (1986)] が挙げられる。特異的領域と非特異的領域との連結は、それぞれ別個に合成した後に行ってもよく、特異的領域を合成した後非特異的領域を1ヌクレオチドずつ順次付加することにより行ってもよい。また、特異的領域と非特異的領域を同時に合成してもよい。

【0022】本発明のオリゴヌクレオチドは、ハイブリダイゼーション用のプローブとして利用する場合には、不溶性担体に固定化された形態で使用してもよい。不溶性担体としては、ニトロセルロース、またはナイロンからなるフィルター、ガラス板、多孔質ガラス、シリカゲル、ラテックスなどが挙げられる。これらの不溶性担体に本発明のオリゴヌクレオチドを固定化する方法は、特に限定されるものではなく、例えば、アミノ修飾したオリゴヌクレオチドを用いる場合には、表面に高密度のカルボキシル基を有するナイロンフィルター上にカルボキシル基を水溶性カルボジイミドによって活性化し、アミド結合させる手法 [J. Org. 262525 (1961)] や、ビオチン修飾したオリゴヌクレオチドの場合にはアビジンを表面にコーティングした担体にビオチン-アビジン反応で結合させる方法 [Biochemistry 11 2291 (1972)]、アミノ修飾したオリゴヌクレオチドをトレシル基を導入したシリカゲルに固定化する方法 [Analytical Chemistry Symposium Series 9203 (1981)] が挙げられる。また、フィルター上で固定化されたオリゴヌクレオチドを作製する方法として、フォトリソグラフィを応用した手法によって固相上で多種類のDNAを同時に合成する方法 [Science, 251767 (1991)] やシールされたガラス板上にDNA合成試薬を接触させることによる合成法 [Nucleic Acids Res. 22 1368 (1994)] 等も使用することができる。

【0023】上記で詳述した本発明のオリゴヌクレオチドは、核酸の塩基配列解析に利用することができる。すなわち本発明の核酸の塩基配列解析法は、上記オリゴヌクレオチドを試料核酸にハイブリダイズさせるステップと、そのハイブリダイゼーション強度またはハイブリダイゼーションの有無により、前記試料核酸中における前記オリゴヌクレオチド中の特異的領域の塩基配列と相補的な配列を有する標的配列の有無を判定するステップとを含む。本発明の方法により、ハイブリダイゼーション

補的なハイブリッドとミスマッチを有するハイブリッド、特に従来法で区別が困難であった末端ミスマッチが区別し易くなり、それによってハイブリダイゼーション法によるDNA塩基配列解析が容易になる。

【0024】次に、本発明のオリゴヌクレオチドを用いたハイブリダイゼーションにおいて、ミスマッチが存在する場合のハイブリダイゼーションと、ミスマッチを含まないハイブリダイゼーションとを如何にして正確かつ高感度に区別することができるかを説明する。図1は、通常

のオリゴヌクレオチドとこのオリゴヌクレオチドにほぼ相補的であるがミスマッチを含む試料核酸とのハイブリッドを示す模式図である。一般的に、ミスマッチがハイブリッドの中央部に存在する場合にはハイブリダイゼーションに重大な障害となるが、ハイブリッドの末端付近にある場合には、中央部に存在する場合に比べて障害は小さい。

【0025】上記オリゴヌクレオチドと同一の配列の特異的領域を有する本発明のオリゴヌクレオチドと上記試料核酸とのハイブリッドを模式的に図2に示す。図2においてNは5-ニトロインドールおよび/または3-ニトロピロールを含むユニバーサル塩基を表す。この図に示されるように、ユニバーサル塩基はいずれのヌクレオチドの塩基とも塩基対を形成することができるので、非特異的領域の分だけハイブリッドの長さは延長される。すなわち、通常のオリゴヌクレオチドではハイブリッドの末端に存在していたミスマッチは、本発明のオリゴヌクレオチドではハイブリッドの中央部に位置することとなる。また、ハイブリダイゼーション強度も高くなる。したがって、ミスマッチを含まないハイブリダイゼーションとミスマッチを含むハイブリダイゼーションを区別することが容易になる。非特異的領域が特異的領域の5'末端に連結されていれば、特異的領域の5'末端側のミスマッチを検出しやすくなり、非特異的領域が特異的領域の3'末端に連結されていれば、特異的領域の3'末端側のミスマッチを検出しやすくなる。さらに、非特異的領域が特異的領域の5'末端及び3'末端の両方に連結されていれば、特異的領域の5'末端側及び3'末端側のミスマッチの両方を検出することが容易となる。5-ニトロインドールおよび/または3-ニトロピロールは上記の効果をも特に顕著に奏するものである。

【0026】本発明のオリゴヌクレオチドを用いたハイブリダイゼーションの条件は、特に限定されるものではなく、試料核酸の種類や配列、及びオリゴヌクレオチドの配列によって至適な条件は変化し得る。例えば、比較的短鎖のオリゴヌクレオチドを用いた場合は、ハイブリダイゼーション温度を低温にするなど条件を緩く設定することが望ましい。また、DNA塩基配列中にGC残基が多い場合は、AT残基が多い場合に比してハイブリッドの安定性は強まるが、この現象を相殺するためにテトラメチルアンモニウムクロライド等のテトラアルキルア

ンモニウム塩を用いる方法〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 1585 (1985)〕が効果的である。またハイブリダイゼーション溶液中に界面活性剤、例えば、ドデシル硫酸ナトリウム (Sodium Dodecylsulfate)、N-ラウロイルサルコシン酸ナトリウム (Sodium N-Lauroylsarcosinate) 等を添加する方法もハイブリダイゼーション感度の向上に効果的である (例えば、特開平8-70900実施例C参照)。

【0027】核酸の塩基配列の解析をハイブリダイゼーションによって行う場合、試料核酸または本発明のオリゴヌクレオチドのいずれかが標識されていることが好ましい。標識化の方法は特に限定されるものではなく、例えば、ラジオアイソトープや蛍光色素を用いる手法等を挙げることができる。ハイブリダイゼーションの結果は、各種標識法に即した方法によって測定することができる。

【0028】本発明の塩基配列解析の応用例としては、ハイブリダイゼーション法を用いたDNA塩基配列の決定〔Genomics, 13 1378 (1992)〕や感染症及び遺伝的疾患の診等、巨大ゲノムDNAのマッピング等に応用可能である。感染症の診断法としては、例えば、被験者の血液等よりDNAを抽出し、そのDNAに対して各種病原体固有の配列から本発明の方法によりDNAプローブを作製し、ハイブリダイゼーション反応を行い、病原体の存在を検出する方法が挙げられる。遺伝的疾患の診断法としては、遺伝病の原因遺伝子に特異的な配列をもとに本発明の方法によりオリゴヌクレオチドを作製し、被験者より得た染色体DNAとのハイブリダイゼーションを行い、その遺伝子中の変異の有無を検出する。巨大ゲノムDNAのマッピングはゲノムDNA解析プロジェクト等には必須の技術であるが、ゲノムバンクに対して本発明の方法で作製した多数のDNAプローブとハイブリダイゼーションを行うことで各クローンのゲノム上での配置が決定できる〔第16回日本分子生物学会年会 講演要旨集 1334 (1993)〕。

【0029】DNA塩基配列の決定は、従来、DNAを化学的に分解する方法〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74 560 (1977)〕やDNA合成酵素による方法〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74 5463 (1977)〕が用いられているが、ハイブリダイゼーション法を用いたDNA塩基配列の解析法 (SBH; Sequencing By Hybridization) は、近年注目されている手法である〔Science, 260 1649 (1993)〕。SBH法は、適当なハイブリダイゼーション条件を設定することで、目的の長鎖DNAに対して、それと完全に相補的なオリゴDNAプローブのみを選択的にハイブリダイズさせ、特異的にハイブリダイズしたオリゴDNAプローブのデータを集積し解析することで、目的の長鎖DNAの塩基配列を決定する技術である。

【0030】

【実施例】以下に、実施例を挙げて本発明をさらに具体的に説明するが、これらの実施例により本発明は何等限定されるものではない。

【0031】

【実施例A】5-ニトロインドールまたは3-ニトロピロールのヌクレオチドを含むDNAプローブを用いたミスマッチの判別

(A) オリゴヌクレオチドの合成

パーセプティブ・バイオシステムズ (Perceptive Biosystems) 社製のDNA合成機 (装置名 Expedite 8909) を用いて、表1に示す配列を有する本発明のオリゴヌクレオチド、比較対象用オリゴヌクレオチド、及び試料DNAを合成した。固定化用オリゴヌクレオチドの5'末端は、5'-アミノ修飾C6 (グレンリサーチ社製) で修飾した。尚、以下のオリゴヌクレオチドNo. は配列表の配列番号に相当する。

【0032】

【表1】

表1

オリゴヌクレオチド No.	ヌクレオチド配列	備 考
(1) (対照例1)	5'-XTAACTCGC-3'	比較例1, 2用
(2) (比較例1)	5'-XCAACTCGC-3'	実施例1用
(3) (比較例2)	5'-XTAACCCGC-3'	実施例2用
(4) (対照例2)	5'-XIIIIITAACTCGCIIII-3'	比較例3, 4用
(5) (比較例3)	5'-XIIIIICAACTCGCIIII-3'	実施例1用
(6) (比較例4)	5'-XIIIIITAACCCGCIIII-3'	実施例2用
(7) (対照例3)	5'-XNiNiNiNiTAACCTCGCNiNiNiNi-3'	実施例1, 2用
(8) (実施例1)	5'-XNiNiNiNiCAACCTCGCNiNiNiNi-3'	
(9) (実施例2)	5'-XNiNiNiNiTAACCCGCNiNiNiNi-3'	
(10) (対照例4)	5'-XNpNpNpNpTAACCTCGCNpNpNpNp-3'	実施例3, 4用

- (11) (実施例3) 5'-XNpNpNpNpCAACTCGCNpNpNpNp-3'
 (12) (実施例4) 5'-XNpNpNpNpTAACCCGCNpNpNpNp-3'
 (13) (試料DNA1) 5'-CCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCC-3'

上記配列中、Xは5'-アミノ修飾C6、Iはデオキシイノシン、Niは5-ニトロインドールのデオキシリボヌクレオシド、Npは3-ニトロピロールのデオキシリボヌクレオシドを示す。

【0033】上記オリゴヌクレオチド及び試料DNAの合成は標準のプロトコール通りに行い、5'末端の保護基であるトリチル基は除かないサイクルにて合成を終了した。上記(13)の試料DNAをPoros Oligo R3 (PerSeptive Biosystems社製)を用いて精製を行った。上記(1)～(13)のオリゴヌクレオチド及び試料DNAを濃縮乾固した後、(1)～(12)については0.5M重炭酸ナトリウム緩衝液(pH8.4)に、(13)についてはTE緩衝液に懸濁し、260nmの吸光度測定により定量し、1nmol/ μ lに調整した。

【0034】(B)オリゴヌクレオチドの固定化
オリゴヌクレオチドの固定化は、表面に高密度の陰イオン性カルボキシル基を有するナイロン膜にアミノ修飾オリゴヌクレオチドのアミノ基をアミド結合させることにより、以下の通り行った。

【0035】バイオダインC(商標;ポール社製)膜を0.1N HClによりすすぎ、酸性化した後、20% EDC(1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩)に室温15～30分間浸した。脱イオン水及び0.5M重炭酸ナトリウム緩衝液(pH8.4)で軽くすすいだ後、ドットプロット装置(Bio-Rad社製)にセットした。0.5M重炭酸ナトリウム緩衝液

表2

オリゴヌクレオチド No.	ヌクレオチド配列	ハイブリダイゼーション強度
(1) (対照例1)	5'-XTAACTCGC-3'	1
(2) (比較例1)	5'-XCAACTCGC-3'	1.26
(3) (比較例2)	5'-XTAACCCGC-3'	0.95
(4) (対照例2)	5'-XIIIIITAACTCGCIIII-3'	19.7
(5) (比較例3)	5'-XIIIIITAACTCGCIIII-3'	1.14
(6) (比較例4)	5'-XIIIIITAAACCCGCIIII-3'	0.02
(7) (対照例3)	5'-XNiNiNiNiTAACCTCGCNiNiNiNi-3'	13.1
(8) (実施例1)	5'-XNiNiNiNiCAACTCGCNiNiNiNi-3'	0.21
(9) (実施例2)	5'-XNiNiNiNiTAACCCGCNiNiNiNi-3'	0.09
(10) (対照例4)	5'-XNpNpNpNpTAACTCGCNpNpNpNp-3'	1.95
(11) (実施例3)	5'-XNpNpNpNpCAACTCGCNpNpNpNp-3'	0.02
(12) (実施例4)	5'-XNpNpNpNpTAACCCGCNpNpNpNp-3'	0.02

Xは5'-アミノ修飾C6、Iはデオキシイノシン、Niは5-ニトロインドールのデオキシリボヌクレオシド、Npは3-ニトロピロールのデオキシリボヌクレオシドを示す。

液(pH8.4)に懸濁されたアミノ修飾オリゴヌクレオチドを15分間室温で膜と反応させた。TBS(Tris-緩衝食塩水)/0.1% Tween-20によりすすいだ膜を、0.1N NaOHにて10分間処理し、脱イオン水で軽くすすいだ後風乾した。

【0036】(C)試料DNAの標識化
試料DNAの標識化は[γ -³²P]ATPによって、5'末端を放射性ラベルした。反応は、DNA 5'末端標識キット(MEGALABELTM; 宝酒造社製)により行った。

【0037】(D)ハイブリダイゼーション反応
前記のオリゴヌクレオチド固定化フィルターと、放射性標識した試料DNAとを、5×SSC(750mM塩化ナトリウム・75mMクエン酸三ナトリウム)/7% N-ラウロイルサルコシン酸ナトリウム緩衝液中にて、10℃ 2時間ハイブリダイゼーションさせた。ハイブリダイゼーション反応後、2×SSC/0.1% SDS緩衝液にて、10℃、5分間の洗浄を3回行った。風乾した後、オートラジオグラフィーにて、各ドットの放射線量を測定し、ハイブリダイゼーション強度を算出した。

【0038】その結果を表2に示す。結果は対照とした対照例1のオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーション強度を1とする相対値で示した。

【0039】

【表2】

【0040】(E)ミスマッチ判別能の計算
ハイブリダイゼーション反応によって得られた結果より、ミスマッチ判別能を算出した。ミスマッチ判別能と

は、下記のD値(Discrimination value)を指標とする概念であり、ミスマッチの区別し易さをさす。

【0041】

【数1】

試料DNAと完全に相補的な配列のハイブリダイゼーション量

$$D \text{ 値} = \frac{\text{ミスマッチを有する配列のハイブリダイゼーション量}}{\text{試料DNAと完全に相補的な配列のハイブリダイゼーション量}}$$

【0042】試料DNAと完全に相補的な配列のハイブリダイゼーション量とは、対照例の配列のハイブリダイゼーション量を指し、ミスマッチを有する配列のハイブリダイゼーション量とは、その対照例に対応する比較例あるいは実施例の配列のハイブリダイゼーション量を指す。D値は、対照例の配列に対する比較例あるいは実施例の配列のハイブリダイゼーション量の比である。即ち、対照例の配列のD値は1であり、比較例及び実施例 10 に関してはD値が高ければその配列が対照例の配列と区別し易い(ハイブリダイゼーション量が対照例に対して小さい)ことを表す。

【0043】表3に各配列のD値を示す。3', 5' 両

表3 ミスマッチ判別能(D値)

オリゴヌクレオチド No.	ヌクレオチド配列	D 値
(2) (比較例1)	5'-XCAACTCGC-3'	0.79
(3) (比較例2)	5'-XTAACCCGC-3'	17.2
(5) (比較例3)	5'-XIIIIICAACTCGCIIII-3'	17.2
(6) (比較例4)	5'-XIIIIITAACCCGCIIII-3'	45
(8) (実施例1)	5'-XNiNiNiNiCAACTCGC NiNiNiNi-3'	63
(9) (実施例2)	5'-XNiNiNiNiTAACCCGC NiNiNiNi-3'	139
(11) (実施例3)	5'-XNpNpNpNpCAACTCGC NpNpNpNp-3'	98
(12) (実施例4)	5'-XNpNpNpNpTAACCCGC NpNpNpNp-3'	98

Xは5'-アミノ修飾C6、Iはデオキシイノシン、Niは5-ニトロインドールのデオキシリボヌクレオシド、Npは3-ニトロピロールのデオキシリボヌクレオシドを示す。

【0045】

【実施例B】イノシン及び5-ニトロインドールまたは3-ニトロピロールのヌクレオシドを含むDNAプローブを用いたミスマッチの判別

末端にイノシンを導入したオリゴヌクレオチドと比較して、5-ニトロインドールまたは3-ニトロピロールのヌクレオシドを導入したオリゴヌクレオチドの方がD値が顕著に高い。従って、ミスマッチの判別能は、5-ニトロインドールまたは3-ニトロピロールのヌクレオシドを導入したオリゴヌクレオチド、特に3', 5' 両末端に5-ニトロインドールまたは3-ニトロピロールのヌクレオシドを導入したオリゴヌクレオチドが優れていると判断される。

【0044】

【表3】

(A) オリゴヌクレオチドの合成

実施例Aと同様にして、表4に示す配列を有する本発明のオリゴヌクレオチド、比較対象用オリゴヌクレオチド、及び試料DNAを合成した。尚、以下のオリゴヌクレオチドNo. は配列表の配列番号に相当する。

【0046】

【表4】

表4

オリゴヌクレオチド No.	ヌクレオチド配列	備考
(14) (対照例5)	5'-XIIIIITAACCTCGCCIIII-3'	比較例5用
(15) (比較例5)	5'-XIIIIICAACTCGCCIIII-3'	実施例5~10用
(16) (対照例6)	5'-XNiNiNiNiTAACCTCGCC NiNiNiNi-3'	実施例5用
(17) (実施例5)	5'-XNiNiNiNiCAACCTCGCC NiNiNiNi-3'	
(18) (対照例7)	5'-XNpNpNpNpTAACCTCGCC NpNpNpNp-3'	実施例6用
(19) (実施例6)	5'-XNpNpNpNpCAACCTCGCC NpNpNpNp-3'	
(20) (対照例8)	5'-XIINiNiTAACCTCGCC NiNiII-3'	実施例7用
(21) (実施例7)	5'-XIINiNiCAACCTCGCC NiNiII-3'	
(22) (対照例9)	5'-XNiNiIIITAACCTCGCC IINiNi-3'	実施例8用

(23) (実施例8)	5'-XNiNiIICAACTCGCCINiNi-3'	
(24) (対照例10)	5'-XIINpNpTAACTCGCCNpNpII-3'	実施例9用
(25) (実施例9)	5'-XIINpNpCAACTCGCCNpNpII-3'	
(26) (対照例11)	5'-XNpNpIITAACTCGCCINpNp-3'	実施例10用
(27) (実施例10)	5'-XNpNpIICAACTCGCCINpNp-3'	
(13) (試料DNA1)	5'-CCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCC-3'	

上記配列中、Xは5'-アミノ修飾C6、Iはデオキシイノシン、Niは5-ニトロインドールのデオキシリボヌクレオシド、Npは3-ニトロピロールのデオキシリボヌクレオシドを示す。

【0047】上記オリゴヌクレオチド及び試料DNAの合成は、実施例Aに従った。

【0048】(B)オリゴヌクレオチドの固定化
オリゴヌクレオチドの固定化は、実施例Aに従った。

【0049】(C)試料DNAの標識化
試料DNAの標識化は、実施例Aに従った。

【0050】(D)ハイブリダイゼーション反応
前記のオリゴヌクレオチド固定化フィルターと、放射性標識した試料DNAとを、3M TMAC (塩化テトラメチルアンモニウム) / 7% N-ラウロイルサルコシン酸ナトリウム / 50mM トリス塩酸塩 pH8.0 / 2mM EDTA緩衝液中にて、35℃で2時間プレハイブリダイゼーションさせた後、35℃で一晩ハイブリダイゼーションさせた。ハイブリダイゼーション反応後、5×SSPE (0.6M NaCl、4mM リン酸ナトリウム、0.5mM EDTA、pH7.4) / 7% N-ラウロイルサルコシン酸ナトリウム緩衝液にて、35℃、5分間の洗浄を行った後、3M TMAC (塩化テトラメチルアンモニウム) / 7% N-ラウロイルサルコシン酸ナトリウム / 50mM トリス塩酸塩 pH8.0 / 2mM EDTA緩衝液にて、35℃、1時間洗浄を行った。風乾した後、オートラジオグラフィにて、各ドットの放射線量を測定し、ハイブリダイゼーション強度を算出した。

【0051】その結果を表5に示す。結果は対照とした対照例1のオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーション強度を1とする相対値で示した。

【0052】

【表5】

オリゴヌクレオチド No.	ヌクレオチド配列	ハイブリダイゼーション強度
(14) (対照例5)	5'-XIIIIITAACTCGCCIIIII-3'	1
(15) (比較例5)	5'-XIIIIICAACTCGCCIIIII-3'	0.080
(16) (対照例6)	5'-XNiNiNiNiTAACTCGCCNiNiNi-3'	0.023
(17) (実施例5)	5'-XNiNiNiNiCAACTCGCCNiNiNi-3'	0.001
(18) (対照例7)	5'-XNpNpNpTAACTCGCCNpNpNp-3'	0.020
(19) (実施例6)	5'-XNpNpNpCAACTCGCCNpNpNp-3'	0.001
(20) (対照例8)	5'-XIINiNiTAACTCGCCNiNiII-3'	0.419
(21) (実施例7)	5'-XIINiNiCAACTCGCCNiNiII-3'	0.026
(22) (対照例9)	5'-XNiNiIITAACTCGCCINiNi-3'	1.844
(23) (実施例8)	5'-XNiNiIICAACTCGCCINiNi-3'	0.024
(24) (対照例10)	5'-XIINpNpTAACTCGCCNpNpII-3'	0.030
(25) (実施例9)	5'-XIINpNpCAACTCGCCNpNpII-3'	0.001
(26) (対照例11)	5'-XNpNpIITAACTCGCCINpNp-3'	0.580
(27) (実施例10)	5'-XNpNpIICAACTCGCCINpNp-3'	0.002

Xは5'-アミノ修飾C6、Iはデオキシイノシン、Niは5-ニトロインドールのデオキシリボヌクレオシド、Npは3-ニトロピロールのデオキシリボヌクレオシドを示す。

【0053】(E)ミスマッチ判別能の計算
ハイブリダイゼーション反応によって得られた結果より、ミスマッチ判別能を算出した。

【0054】ミスマッチ判別能とは、実施例Aの(E)

で説明したように、D値を指標とする概念であり、ミスマッチの区別し易さをさす。表6に各配列のD値を示す。3', 5'両末端に、5-ニトロインドールのヌクレオシド、3-ニトロピロールのヌクレオシド、または、これらとイノシンの混合物を導入したオリゴヌクレオチドの方が、イノシンのみを導入したオリゴヌクレオチドと比較して顕著にD値が高く、特に、3-ニトロピロールの

ヌクレオシドとイノシンとの混合塩基からなる非特異的領域を導入したオリゴヌクレオチドがD値が高く、ミスマッチ判別能に優れていることが判明した。さらには、イノシンを特異的領域側（内側）に、5-ニトロインドールまたは3-ニトロピロールのヌクレオシドを外側（5'

表6 ミスマッチ判別能（D値）

オリゴヌクレオチド No.	ヌクレオチド配列	D 値
(15) (比較例5)	5'-XIIIIICAACTCGCCIIII-3'	12.5
(18) (実施例5)	5'-XNiNiNiNiCAACTCGCCNiNiNiNi-3'	23.0
(11) (実施例6)	5'-XNpNpNpNpCAACTCGCCNpNpNpNp-3'	20.0
(14) (実施例7)	5'-XIINiNiCAACTCGCCNiNiII-3'	17.3
(17) (実施例8)	5'-XNiNiIICAACTCGCCIIINiNi-3'	76.8
(11) (実施例9)	5'-XIINpNpCAACTCGCCNpNpII-3'	30.0
(11) (実施例10)	5'-XNpNpIICAACTCGCCIIINpNp-3'	29.0

Xは5'-アミノ修飾C6、Iはデオキシイノシン、Niは5-ニトロインドールのデオキシリボヌクレオシド、Npは3-ニトロピロールのデオキシリボヌクレオシドを示す。

【0056】

【発明の効果】本発明によれば、ハイブリダイゼーション感度を上昇させることが可能となるとともに、完全に相補的なハイブリッドとミスマッチを有するハイブリッド、特にハイブリッドの末端部でのミスマッチが区別し易くなり、それによってハイブリダイゼーション法によ

配列

TAACTCGC

【0058】配列番号：2

配列の長さ：8

配列の型：核酸

配列

CAACTCGC

【0059】配列番号：3

配列の長さ：8

配列の型：核酸

配列

TAACCCGC

【0060】配列番号：4

配列の長さ：16

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成オリゴヌクレオチド

配列

NNNNTAACTC GCNNNN

【0061】配列番号：5

配列の長さ：16

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

および3'末端側）に配置したミスマッチの判別能は高く、特に優れていることが判明した。

【0055】

【表6】

るDNA塩基配列解析が容易になる。

【0057】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：8

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成オリゴヌクレオチド

8

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成オリゴヌクレオチド

8

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

20 配列の種類：他の核酸 合成オリゴヌクレオチド

8

配列の特徴：

特徴を表す記号：

存在位置：

特徴を決定した方法：

その他の情報：Nはヒポキサンチンのヌクレオシドを表す。

16

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成オリゴヌクレオチド

配列の特徴：

30 特徴を表す記号：

存在位置：

特徴を決定した方法：

配列

NNNNCAACTC GCNNNN

【0062】配列番号：6

配列の長さ：16

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成オリゴヌクレオチド

配列

NNNNTAACCC GCNNNN

【0063】配列番号：7

配列の長さ：16

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成オリゴヌクレオチド

配列

NNNNTAACTC GCNNNN

【0064】配列番号：8

配列の長さ：16

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成オリゴヌクレオチド

配列

NNNNCAACTC GCNNNN

【0065】配列番号：9

配列の長さ：16

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成オリゴヌクレオチド

配列

NNNNTAACCC GCNNNN

【0066】配列番号：10

配列の長さ：16

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成オリゴヌクレオチド

配列

NNNNTAACTC GCNNNN

【0067】配列番号：11

配列の長さ：16

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成オリゴヌクレオチド

その他の情報：Nはヒポキサンチンのヌクレオシドを表す。

16

配列の特徴：

特徴を表す記号：

存在位置：

特徴を決定した方法：

その他の情報：Nはヒポキサンチンのヌクレオシドを表す。

16

配列の特徴：

10 特徴を表す記号：

存在位置：

特徴を決定した方法：

その他の情報：Nは5-ニトロインドールのヌクレオシドを表す。

16

配列の特徴：

特徴を表す記号：

存在位置：

特徴を決定した方法：

20 その他の情報：Nは5-ニトロインドールのヌクレオシドを表す。

16

配列の特徴：

特徴を表す記号：

存在位置：

特徴を決定した方法：

その他の情報：Nは5-ニトロインドールのヌクレオシドを表す。

16

配列の特徴：

特徴を表す記号：

存在位置：

30 特徴を決定した方法：

その他の情報：Nは3-ニトロピロールのヌクレオシドを表す。

16

配列の特徴：

特徴を表す記号：

存在位置：

特徴を決定した方法：

その他の情報：Nは3-ニトロピロールのヌクレオシドを表す。

19

配列

NNNNCACTC GCNNNN

【0068】配列番号：12

配列の長さ：16

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成オリゴヌクレオチド

配列

NNNNTAACCC GCNNNN

【0069】配列番号：13

配列の長さ：28

配列の型：核酸

配列

CCAACGATCA AGGCGAGTTA CATGATCC

【0070】配列番号：14

配列の長さ：17

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成オリゴヌクレオチド

配列

NNNNTAACTC GCCNNNN

【0071】配列番号：15

配列の長さ：17

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成オリゴヌクレオチド

配列

NNNNCACTC GCCNNNN

【0072】配列番号：16

配列の長さ：17

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成オリゴヌクレオチド

配列

NNNNTAACTC GCCNNNN

【0073】配列番号：17

配列の長さ：17

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成オリゴヌクレオチド

配列

NNNNCACTC GCCNNNN

【0074】配列番号：18

配列の長さ：17

配列の型：核酸

20

16

配列の特徴：

特徴を表す記号：

存在位置：

特徴を決定した方法：

その他の情報：Nは3-ニトロピロールのヌクレオシドを表す。

16

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成オリゴヌクレオチド

28

10 配列の特徴：

特徴を表す記号：

存在位置：

特徴を決定した方法：

その他の情報：Nはヒポキサンチンのヌクレオシドを表す。

17

配列の特徴：

特徴を表す記号：

存在位置：

特徴を決定した方法：

20 その他の情報：Nはヒポキサンチンのヌクレオシドを表す。

17

配列の特徴：

特徴を表す記号：

存在位置：

特徴を決定した方法：

その他の情報：Nは5-ニトロインドールのヌクレオシドを表す。

17

配列の特徴：

特徴を表す記号：

30 存在位置：

特徴を決定した方法：

その他の情報：Nは5-ニトロインドールのヌクレオシドを表す。

17

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成オリゴヌクレオチド

配列の特徴：

特徴を表す記号：

存在位置：

配列

NNNTAACTC GCCNNNN

【0075】配列番号：19

配列の長さ：17

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成オリゴヌクレオチド

配列

NNNNCAACTC GCCNNNN

【0076】配列番号：20

配列の長さ：17

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成オリゴヌクレオチド

配列の特徴：

配列

NNNTAACTC GCCNNNN

【0077】配列番号：21

配列の長さ：17

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成オリゴヌクレオチド

配列の特徴：

配列

NNNNCAACTC GCCNNNN

【0078】配列番号：22

配列の長さ：17

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成オリゴヌクレオチド

配列の特徴：

配列

NNNTAACTC GCCNNNN

【0079】配列番号：23

配列の長さ：17

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成オリゴヌクレオチド

配列の特徴：

配列

NNNNCAACTC GCCNNNN

【0080】配列番号：24

特徴を決定した方法：

その他の情報：Nは3-ニトロピロールのヌクレオシドを表す。

17

配列の特徴：

特徴を表す記号：

存在位置：

特徴を決定した方法：

その他の情報：Nは3-ニトロピロールのヌクレオシドを表す。

17.

10 特徴を表す記号：

存在位置：

特徴を決定した方法：

その他の情報：塩基番号1、2、16及び17のNはヒポキサンチンのヌクレオシド、塩基番号3、4、14及び15のNは5-ニトロインドールのヌクレオチドを表す。

17

特徴を表す記号：

存在位置：

特徴を決定した方法：

20 その他の情報：塩基番号1、2、16及び17のNはヒポキサンチンのヌクレオシド、塩基番号3、4、14及び15のNは5-ニトロインドールのヌクレオチドを表す。

17

特徴を表す記号：

存在位置：

特徴を決定した方法：

その他の情報：塩基番号1、2、16及び17のNは5-ニトロインドールのヌクレオシド、塩基番号3、4、14及び15のNはヒポキサンチンのヌクレオチドを表す。

30

17

特徴を表す記号：

存在位置：

特徴を決定した方法：

その他の情報：塩基番号1、2、16及び17のNは5-ニトロインドールのヌクレオシド、塩基番号3、4、14及び15のNはヒポキサンチンのヌクレオチドを表す。

17

配列の長さ：17

配列の型：核酸
鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：他の核酸 合成オリゴヌクレオチド
配列の特徴：
特徴を表す記号：

配列

NNNNTAACTC GCCNNNN

【0081】配列番号：25

配列の長さ：17
配列の型：核酸
鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：他の核酸 合成オリゴヌクレオチド
配列の特徴：

配列

NNNNCAACTC GCCNNNN

【0082】配列番号：26

配列の長さ：17
配列の型：核酸
鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：他の核酸 合成オリゴヌクレオチド
配列の特徴：

配列

NNNNTAACTC GCCNNNN

【0083】配列番号：27

配列の長さ：17
配列の型：核酸
鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：他の核酸 合成オリゴヌクレオチド
配列の特徴：

配列

NNNNCAACTC GCCNNNN

【図面の簡単な説明】

【図1】 通常のオリゴヌクレオチドと核酸とのハイブリッドを示す模式図。

【図1】

CCGCTCAT
|||||
.....CCAACGATCAAGCGAGTTACATGATCC.....

存在位置：
特徴を決定した方法：
その他の情報：塩基番号1、2、16及び17のNはヒポキサンチンのヌクレオシド、塩基番号3、4、14及び15のNは3-ニトロピロールのヌクレオシドを表す。

17

特徴を表す記号：

存在位置：

特徴を決定した方法：

10 その他の情報：塩基番号1、2、16及び17のNはヒポキサンチンのヌクレオシド、塩基番号3、4、14及び15のNは3-ニトロピロールのヌクレオシドを表す。

17

特徴を表す記号：

存在位置：

特徴を決定した方法：

20 その他の情報：塩基番号1、2、16及び17のNは3-ニトロピロールのヌクレオシド、塩基番号3、4、14及び15のNはヒポキサンチンのヌクレオシドを表す。

17

特徴を表す記号：

存在位置：

特徴を決定した方法：

その他の情報：塩基番号1、2、16及び17のNは3-ニトロピロールのヌクレオシド、塩基番号3、4、14及び15のNはヒポキサンチンのヌクレオシドを表す。

17

【図2】 本発明のオリゴヌクレオチドと核酸とのハイブリッドを示す模式図。

【図2】

NNNCCGCTCATNNNN
|||||||
.....CCAACGATCAAGCGAGTTACATGATCC.....

フロントページの続き

(72)発明者 湯川 英明
茨城県稲敷郡阿見町中央八丁目3番1号三
菱化学株式会社筑波研究所内